

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Preparasi Sampel**

##### **1. Pengumpulan dan Penyiapan Bahan**

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah biji labu kuning (*Cucurbita moschata Duch Poir*) yang diperoleh dari Salatiga, Jawa Tengah. Determinasi tanaman bertujuan untuk membuktikan kebenaran bahan yang digunakan pada penelitian ini. Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Biologi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Hasil determinasi tanaman menunjukkan bahwa biji yang digunakan adalah biji *Cucurbita moschata Duch Poir* seperti yang tertera pada lampiran 1.

Biji *C. moschata* yang akan digunakan pada penelitian ini telah melalui proses pencucian dan sortasi untuk mendapatkan biji dengan kualitas baik, kemudian dilakukan pengeringan. Pengeringan dilakukan untuk menghentikan reaksi enzimatik yang dapat menyebabkan penguraian atau perubahan kandungan kimia yang terdapat pada biji *C. moschata*. Proses selanjutnya dilakukan proses pembuatan serbuk dan pengayakan. Proses ini bertujuan untuk mendapatkan serbuk simplisia yang homogen dan untuk mempermudah penarikan senyawa aktif yang digunakan sebagai antioksidan dan antibakteri, yaitu flavonoid dan alkaloid.

## 2. Proses Ekstraksi

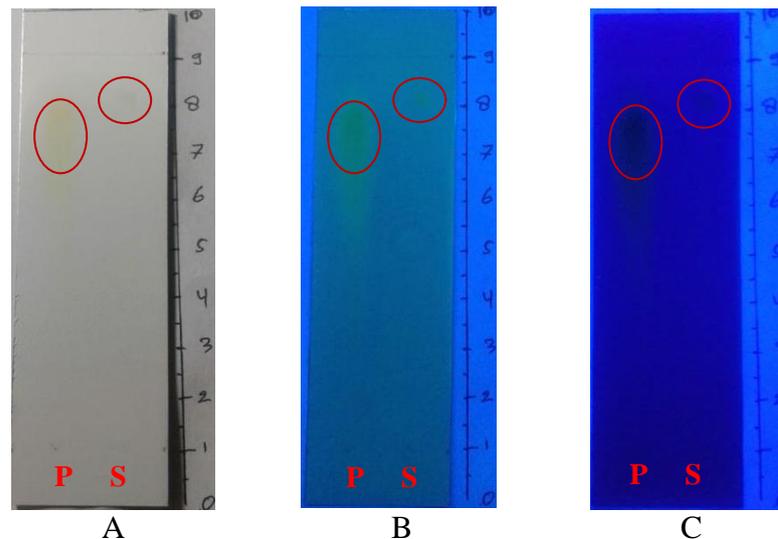
Ekstraksi adalah metode penarikan metabolit sekunder dari tumbuhan atau bagian tumbuhan dengan pelarut yang sesuai (Tiwari, *et al.*, 2011). Pemilihan jenis pelarut dan metode ekstraksi merupakan bagian penting dalam ekstraksi. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 70%. Etanol adalah pelarut universal yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semi polar, dan nonpolar. Digunakan etanol 70% karena bahan yang digunakan berupa serbuk kering, adanya air diperlukan agar sel-sel biji *C. moschata* dapat mengembang sehingga pelarut mudah masuk ke dalam sel.

Biji *C. moschata* yang diperoleh diekstraksi menggunakan metode maserasi. Filtrat hasil maserasi diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan kecepatan putaran 90 rpm. Penguapan ini bertujuan untuk memisahkan pelarut dari senyawanya. Untuk mendapatkan ekstrak kental dilakukan penguapan kembali menggunakan *waterbath*, hal ini bertujuan untuk menjaga suhu agar tetap berada dibawah titik didih air yaitu 100°C. Dari metode maserasi ini didapatkan rendemen sebesar 3,7561% b/b.

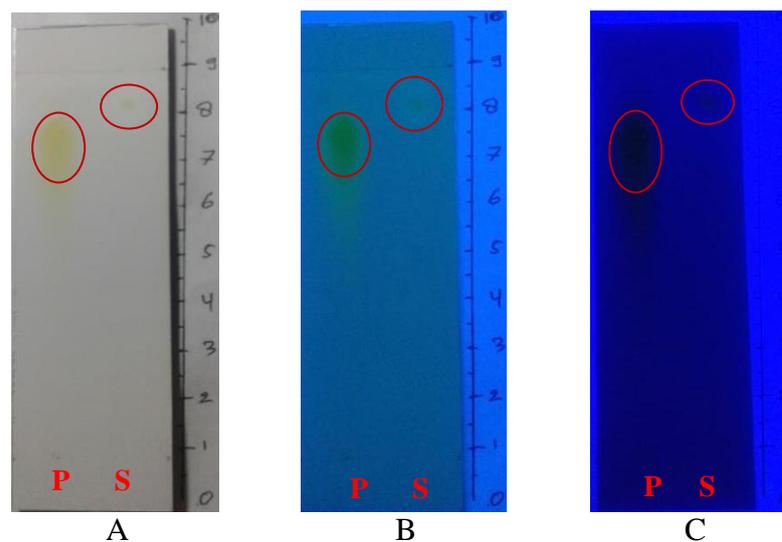
### B. Identifikasi senyawa

Senyawa yang diidentifikasi pada penelitian ini adalah senyawa flavonoid dan alkaloid. Untuk mengetahui adanya kandungan senyawa tersebut dilakukan uji identifikasi senyawa menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Pada uji flavonoid digunakan fase diam selulosa dan plat silika gel GF<sub>254</sub> sebagai fase diam pada uji alkaloid. Fase gerak yang digunakan adalah larutan butanol : asam asetat : air dengan perbandingan 4 : 1 : 5. Uji ini merupakan kromatografi partisi fase

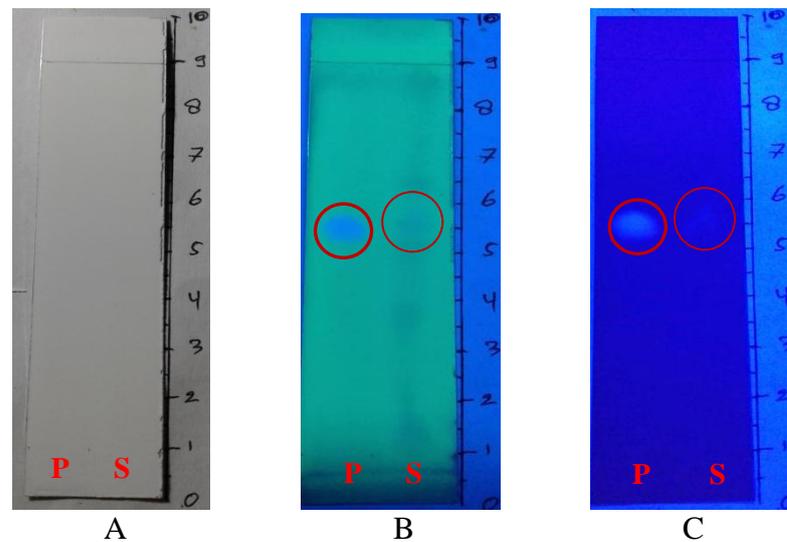
terbalik, dimana fase gerak lebih polar dibanding fase diam. Bercak pada fase diam dapat diamati pada cahaya tampak dan dibawah sinar UV kemudian dihitung  $R_F$ -nya. Hasil KLT dapat dilihat pada Gambar 7, 8, 9, dan 10.



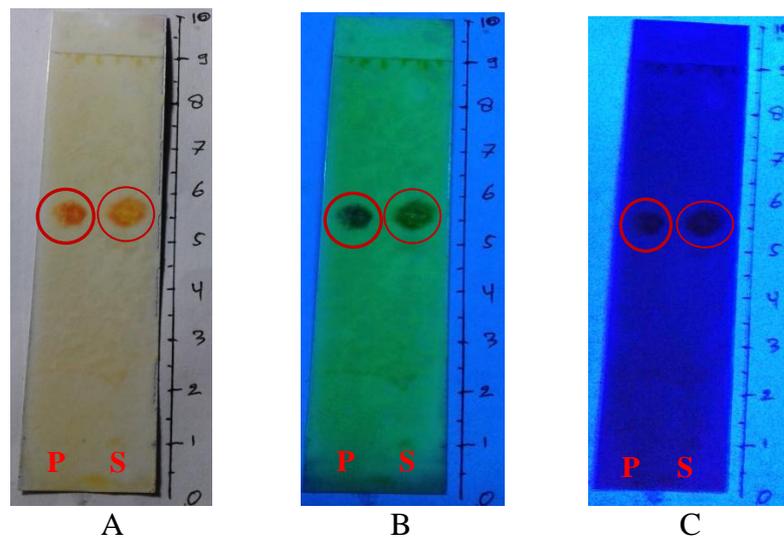
**Gambar 7.** Hasil uji identifikasi flavonoid sebelum disemprot pereaksi amoniak. keterangan: A. sinar tampak, B. UV 254 nm, C. UV 366 nm, (P) senyawa pembanding kuersetin, (S) ekstrak etanolik *C. moschata*.



**Gambar 8.** Hasil uji identifikasi flavonoid setelah disemprot pereaksi amoniak. keterangan: A. sinar tampak, B. UV 254 nm, C. UV 366 nm, (P) senyawa pembanding kuersetin, (S) ekstrak etanolik *C. moschata*.



**Gambar 9.** Hasil uji identifikasi alkaloid sebelum disemprot pereaksi dragendorff  
keterangan: A. sinar tampak, B. UV 254 nm, C. UV 366 nm, (P) senyawa  
pembanding kuinin, (S) ekstrak etanolik *C. moschata*.



**Gambar 10.** Hasil uji identifikasi alkaloid setelah disemprot pereaksi dragendorff  
keterangan: A. sinar tampak, B. UV 254 nm, C. UV 366 nm, (P) senyawa  
pembanding kuinin, (S) ekstrak etanolik *C. moschata*.

Hasil uji identifikasi senyawa seperti yang terlihat pada gambar 7, 8, 9 dan 10 menunjukkan adanya perbedaan penampakan bercak sebelum dan setelah plat disemprot dengan pereaksi. Bercak terlihat lebih jelas pada plat yang telah disemprot dengan pereaksi. Setelah plat silika disemprot pereaksi dragendorff

menunjukkan bercak warna orange, hal ini sesuai dengan Gibbons (2006) yang menyatakan bahwa setelah disemprot dragendorff deteksi alkaloid menghasilkan warna oranye pekat hingga merah.

Pada identifikasi senyawa flavonoid setelah disemprot amoniak timbul noda berwarna kuning terang dibawah sinar tampak dan UV 254 nm serta berwarna biru pada UV 366 menegaskan adanya kandungan flavonoid pada ekstrak etanolik biji *C. moschata*. Hal ini sesuai dengan pendapat Wagner dan Bladt (2001) yang menyebutkan bahwa flavonoid dapat berfluoresensi dan memberikan warna kuning, hijau, maupun biru serta berwarna kuning lebih intens setelah diuapi amoniak. Flavonoid yang berwarna kuning terang atau coklat kuning setelah direaksikan dengan amoniak merupakan jenis flavonol glikosida (Harborne, 2006). Berdasar pengamatan visual KLT didapatkan hasil seperti yang tertera pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Hasil identifikasi senyawa pada plat KLT

Senyawa	Bercak sebelum disemprot pereaksi			Bercak setelah disemprot pereaksi			Jarak senyawa (cm)	Jarak eluen (cm)	Rf
	Sinar tampak	UV 254nm	UV 366nm	Sinar tampak	UV 254nm	UV 366 nm			
<b>1. Flavonoid</b>									
Kuersetin	Kuning terang	Kuning terang	Biru meredam	Kuning terang	Kuning terang	Biru meredam	6,25	8	0,78
Sampel	Kuning samar	Kuning samar	Biru meredam	Kuning gelap	Kuning gelap	biru meredam	7	8	0,87
<b>2. Alkaloid</b>									
Kuinin	Tak tampak	Biru berpendar	Biru ber- pendar	orange	Coklat meredam	Biru meredam	4,5	8	0,56
Sampel	Tak tampak	Biru berpendar	Biru ber- pendar	orange	Coklat meredam	Biru meredam	4,5	8	0,56

Identifikasi senyawa menggunakan KLT juga dilakukan dengan membandingkan nilai Rf ekstrak etanolik biji *C. moschata* dengan senyawa pembandingnya. Identifikasi senyawa flavonoid ekstrak etanolik biji *C. moschata* menunjukkan Rf 0,87 sedangkan kuersetin sebagai pembandingnya memiliki Rf 0,78. Hal ini menandakan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung pada ekstrak etanolik biji *C. moschata* memiliki polaritas yang lebih tinggi dibanding kuersetin. Dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa senyawa flavonoid yang diidentifikasi merupakan glikosida dari kuersetin yang termasuk golongan flavonol.

Pada uji identifikasi senyawa alkaloid didapatkan nilai Rf 0,56 dengan warna orange setelah disemprot pereaksi dragendorff. Nilai Rf tersebut memiliki Rf dan warna yang sama dengan senyawa pembanding kuinin. Kuinin termasuk dalam alkaloid kuinolin (Harborne, 2006), sehingga memungkinkan bahwa senyawa alkaloid yang terkandung dalam ekstrak etanolik biji *C. moschata* merupakan alkaloid golongan kuinolin.

### **C. Uji aktivitas antioksidan**

Pengujian aktivitas antioksidan secara kuantitatif dilakukan dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) secara spektrofotometri sinar tampak. Metode DPPH dipilih karena merupakan metode yang sederhana, mudah, cepat, dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk evaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa bahan alam (Molyneux, 2004). Metode ini didasarkan pada perubahan warna radikal DPPH. Aktivitas antioksidan suatu senyawa ditunjukkan dengan adanya pengurangan intensitas warna ungu

dari larutan DPPH yang telah ditambahkan larutan uji, sehingga dilakukan uji pada berbagai seri kadar ekstrak etanolik biji *C. moschata*. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanolik biji *C. moschata* dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Hasil uji antioksidan

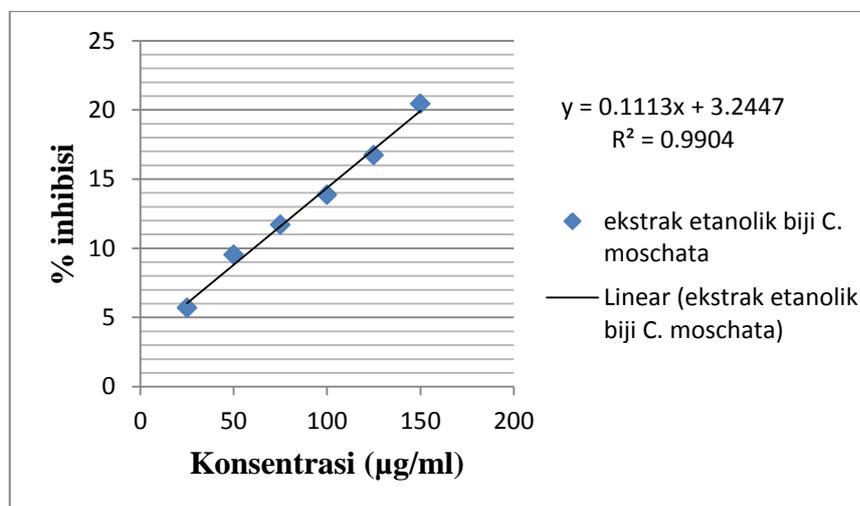
No.	Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbansi	%inhibisi
		rata-rata $\pm$ SD	Rata-rata $\pm$ SD
1	25	0,550 $\pm$ 0,004	5,70 $\pm$ 0,80
2	50	0,528 $\pm$ 0,009	9,52 $\pm$ 1,64
3	75	0,515 $\pm$ 0,004	11,69 $\pm$ 0,77
4	100	0,503 $\pm$ 0,002	13,86 $\pm$ 0,45
5	125	0,486 $\pm$ 0,002	16,72 $\pm$ 0,39
6	150	0,464 $\pm$ 0,007	20,43 $\pm$ 1,24

Berdasarkan Tabel 4 dapat dilihat bahwa semakin besar konsentrasi yang diberikan, maka absorbansi yang dihasilkan semakin kecil. Penurunan absorbansi disebabkan adanya peredaman radikal bebas DPPH akibat adanya donor atom hidrogen (*Hydrogen atom transfer*) dari senyawa hidroksil, sehingga DPPH mengalami reduksi menjadi DPPH-H (Marxen, *et al.*, 2007). Hal ini ditunjukkan dengan perubahan warna ungu yang memudar pada DPPH. Semakin tinggi konsentrasi larutan uji maka semakin besar pula peredaman warnanya yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning.

Perubahan intensitas warna ungu terjadi karena adanya peredaman radikal bebas yang dihasilkan oleh bereaksinya molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul senyawa sampel, sehingga terbentuk senyawa Difenil pikril hidrazin dan menyebabkan terjadinya penurunan absorbansi panjang gelombang maksimum DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Molyneux, 2004). Dengan penurunan nilai absorbansi maka persen inhibisi yang dihasilkan semakin besar. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh

Nurjanah, *et al* (2011) bahwa persen inhibisi terhadap aktivitas radikal bebas meningkat seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak.

Hasil pengukuran diinterpretasikan ke dalam kurva hubungan konsentrasi terhadap persen inhibisi. Persamaan garis yang diperoleh digunakan untuk mencari nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi suatu senyawa yang dapat menyebabkan aktivitas DPPH berkurang 50%.  $IC_{50}$  adalah parameter dalam menentukan aktivitas antioksidan. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  menunjukkan aktivitas antioksidan semakin tinggi (Molyneux, 2004). Nilai  $IC_{50}$  diperoleh dari persamaan  $y = ax + b$  pada kurva regresi linear hubungan konsentrasi (x) dan persentase peredaman (y). Nilai  $IC_{50}$  dikatakan aktif sebagai antioksidan jika memiliki  $IC_{50} < 200 \mu\text{g/ml}$  (Kresnawaty dan Zainuddin, 2009).



**Gambar 11.** Kurva hubungan konsentrasi terhadap persen inhibisi

Dari kurva pada Gambar 11, didapatkan persamaan regresi linier  $Y = 0,1113X + 3.2447$  dengan  $R^2 = 0,9904$ . Nilai  $R^2$  yang mendekati 1 menunjukkan bahwa % Inhibisi memiliki korelasi dengan konsentrasi ekstrak uji (Marliani, *et al.*, 2014). Setelah dilakukan perhitungan didapatkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanolik

biji *C. moschata* pada konsentrasi 420,08 µg/ml, artinya pada ekstrak etanolik biji *C. moschata* membutuhkan konsentrasi sebesar 420,08 µg/ml untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50%. Pada perhitungan pembandingan kuersetin (Lampiran 4) didapatkan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 2,55 µg/ml. Hasil ini mendekati nilai IC<sub>50</sub> kuersetin yang diperoleh pada penelitian Michielin, *et al.* (2010) yaitu 2,45 µg/ml. Ekstrak etanolik biji *C. moschata* memiliki daya antioksidan yang jauh lebih rendah apabila dibandingkan dengan kuersetin serta menurut klasifikasi aktivitas antioksidan oleh Molyneux (2004) nilai IC<sub>50</sub> > 150 µg/ml termasuk kategori lemah. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanolik biji *C. moschata* memiliki aktivitas lemah dalam meredam radikal bebas DPPH.

Berdasarkan uji identifikasi senyawa dengan KLT menunjukkan bahwa ekstrak etanolik biji *C. moschata* mengandung senyawa flavonoid dan alkaloid. Flavonoid merupakan antioksidan eksogen yang mengandung gugus fenolik dan telah dibuktikan bermanfaat dalam mencegah kerusakan sel akibat stress oksidatif. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antioksidan adalah dengan mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menstabilkan radikal bebas yang reaktif (Arora, *et al.*, 1998). Menurut Kurniati (2013) mekanisme alkaloid sebagai antioksidan juga dengan cara mendonorkan atom H pada radikal bebas.

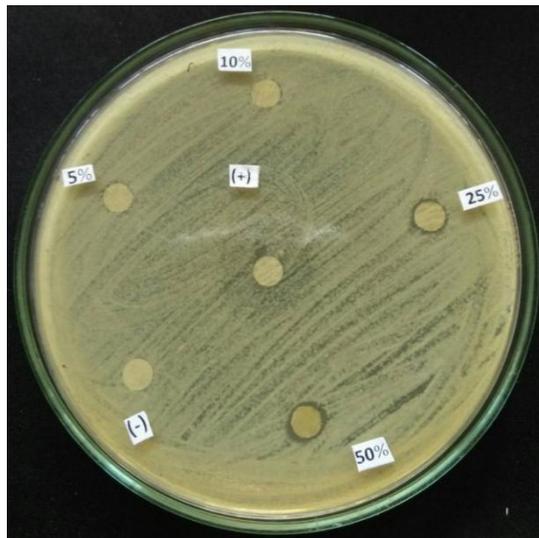
Ekstrak etanolik biji *C. moschata* mengandung senyawa flavonoid dan alkaloid, namun memiliki aktivitas antioksidan lemah. Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanolik biji *C. moschata* adalah golongan flavonol glikosida. Menurut Ery (2013) senyawa flavonoid dalam bentuk ekstrak yang tidak murni kemungkinan masih berikatan dengan gugus glikosida karena gugus glikosida

yang berikatan dengan flavonoid dapat menurunkan aktivitas antioksidan. Pada ekstrak etanolik biji *C. moschata* diduga juga masih terdapat senyawa pengganggu yang menghalangi proses penangkapan radikal bebas. Adanya senyawa protein dan lemak pada ekstrak dapat mengganggu proses penangkapan radikal bebas oleh senyawa fenolik atau flavonoid (Elsha, 2012).

#### **D. Uji aktifitas antibakteri**

Ekstrak diuji aktivitas penghambatannya terhadap *Staphylococcus aureus* strain FNCC 0047. Uji antibakteri ekstrak etanolik biji *C. moshata* terhadap pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menggunakan metode Kirby-Bauer yang sering disebut dengan difusi cakram (*disk diffusion test*). Metode Kirby-Bauer digunakan untuk menentukan sensitifitas bakteri pathogen baik yang bersifat aerob maupun anaerob fakultatif terhadap berbagai senyawa antimikroba (Hudzucki, 2013).

Ekstrak etanolik biji *C. moschata* diujikan pada *S. aureus* dengan konsentrasi 5%, 10%, 25% dan 50%. Sebagai kontrol positif digunakan tetrasiklin dan ciprofloksasin serta DMSO sebagai kontrol negatif. Konsentrasi yang digunakan pada tetrasiklin adalah 0,02%. Berdasarkan penelitian Sarjono dan Mulyani (2007), jika dibandingkan dengan ampisilin dan amoksisilin, tetrasiklin memperoleh zona bening paling besar. Mekanisme kerja tetrasiklin adalah menghalangi terikatnya RNA pada bagian spesifik dari ribosom, akibatnya sintesis protein mengalami hambatan (Widjajanti, 1988).

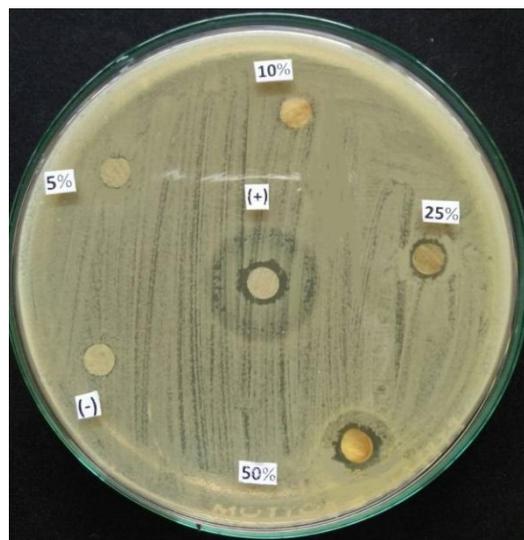


**Gambar 12.** Hasil pengamatan DZI uji antimikroba (pembanding tetrasiklin)  
Keterangan: (+) tetrasiklin, (-) DMSO

Pada Gambar 12 terlihat zona bening pada konsentrasi 25% dan 50%, namun pada kontrol negatif, konsentrasi 5% dan 10% tidak terjadi aktivitas hambat terhadap bakteri *S. aureus*. Tetrasiklin sebagai kontrol positif menurut Kamarudin, *et al.* (2014) memiliki aktivitas hambat yang kuat terhadap *S. aureus* ternyata tidak terdapat zona bening disekitar *disk* antibiotik tersebut. Pada penelitian Febriani (2014), tetrasiklin digunakan sebagai kontrol positif dengan diameter zona inhibisi sebesar 16,6 mm yang termasuk kategori kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Kontrol positif digunakan sebagai pembanding apakah uji yang telah kita lakukan valid dengan membandingkan nilai kontrol pembanding dengan literatur. Karena hasil yang didapat tidak sesuai dengan literatur maka dilakukan uji dengan menggunakan kontrol positif ciprofloksasin. Ciprofloksasin merupakan antibiotik golongan kuinolon dengan mekanisme kerja menghambat DNA girase (topoisomerase II) dan topoisomerase IV yang terdapat dalam bakteri (Mitchell

dsn Cranswick, 2008). Penghambatan terhadap enzim yang terlibat dalam replikasi, rekombinasi dan reparasi DNA tersebut mengakibatkan penghambatan terhadap pertumbuhan sel bakteri (Sarro dan Sarro, 2001). Hasil uji dapat dilihat pada Gambar 13.



**Gambar 13.** Hasil pengamatan DZI uji antimikroba (pembanding ciprofloxasin)  
Keterangan: (+) ciprofloxasin, (-) DMSO

Pada Gambar 13, terdapat zona hambat yang tidak sempurna pada kontrol positif ciprofloxasin, sedangkan menurut Makagansa, *et al.* (2015) penggunaan ciprofloxasin 5 $\mu$ g/ml terhadap bakteri *S. aureus* menghasilkan zona bening sebesar 28,2mm yang termasuk dalam kategori sangat kuat. Hal tersebut dimungkinkan terjadi karena adanya mekanisme resistensi oleh bakteri. Resistensi terjadi ketika bakteri berubah dalam satu atau lain hal yang menyebabkan turun atau hilangnya efektivitas obat, senyawa kimia atau bahan lainnya yang digunakan untuk mencegah atau mengobati infeksi. Menurut Jawetz, *et al.* (2005) mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik diantaranya melalui mekanisme mikroorganisme menghasilkan enzim dan merusak obat yang aktif,

mikroorganisme merubah permeabilitasnya terhadap obat, mikroorganisme mengubah struktur target untuk obat, mikroorganisme mengembangkan jalur metabolisme baru menghindari jalur yang biasa dihambat oleh obat, dan mikroorganisme mengembangkan enzim baru yang masih dapat melakukan fungsi metaboliknya tapi sedikit dipengaruhi oleh obat.

Hasil uji aktivitas antibakteri (Gambar 13) menunjukkan hal yang sama dengan hasil uji sebelumnya (Gambar 12), bahwa pada konsentrasi 25% dan 50% terdapat zona bening di sekitar *disk* yang artinya terjadi aktivitas inhibisi terhadap pertumbuhan *S. aureus*. Untuk kontrol negatif menunjukkan bahwa DMSO tidak mempunyai zona hambat, sehingga DMSO sebagai pelarut tidak mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus*. Hasil pengukuran zona hambat ekstrak etanolik biji *C. moshata* terhadap *S. aureus* seperti disajikan pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Hasil pengukuran diameter zona hambat

No.	Bahan Uji	Diameter Zona Inhibisi (mm)						Rata-rata (mm)
		Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.4	Rep.5	Rep. 6	
1	Cm 5%	0	0	0	0	0	0	0
2	Cm 10%	0	0	0	0	0	0	0
3	Cm 25%	1,37	1,37	1,25	1,62	1,00	1,25	1,31
4	Cm 50%	2,21	2,00	2,25	2,50	2,25	2,25	2,24
5	Tetra	13,75	12,62	12,00	Tidak dilakukan uji	Tidak dilakukan uji	Tidak dilakukan uji	12,79
6	Cipro	Tidak dilakukan uji	Tidak dilakukan uji	Tidak dilakukan uji	14,00	14,75	13,62	14,12
7	DMSO	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: (Cm) *Cucurbita moschata*

*S. aureus* yang merupakan bakteri Gram positif memiliki kandungan peptidoglikan yang tebal, lipid yang rendah, dan tidak memiliki lipoprotein dan lipopolisakarida (Tortora *et al.* 2007). Peptidoglikan merupakan suatu senyawa polar yang mudah bereaksi dengan senyawa polar (Volk dan Wheeler 1988).

Berdasarkan uji identifikasi senyawa menunjukkan bahwa ekstrak etanolik biji *C. moschata* mengandung senyawa flavonoid dan alkaloid. Menurut Pelczar, *et al.* (1986) mekanisme kerja senyawa flavonoid adalah dengan mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sitoplasma. Volk dan Wheeler (1988) menjelaskan bahwa senyawa flavonoid dapat merusak membran sitoplasma yang dapat menyebabkan bocornya metabolit penting dan menginaktifkan sistem enzim bakteri. Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh, terganggunya sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding selnya hanya meliputi membran sel (Retnowati, *et al.*, 2011).

Rendahnya kandungan lipid serta lipoprotein dan lipopolisakarida yang tidak terkandung pada *S. aureus* menyebabkan bakteri ini tidak dapat mempertahankan permeabilitas sel. Peptidoglikan yang mengalami denaturasi, kandungan lipid yang sedikit, dan ketiadaan lipoprotein dan lipopolisakarida pada *S. aureus* menyebabkan bakteri ini mengalami lisis dan membentuk zona bening (Harahap dan Hidayat, 2015). Ketersediaan senyawa flavonoid dan alkaloid yang terkandung dalam ekstrak etanolik biji *C. moschata* mampu menghambat bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 25% (1,31mm) dan 50% (2,24mm). Menurut klasifikasi aktivitas antibakteri Davis dan Stout (1971) hasil tersebut termasuk kategori lemah (< 5mm).

Lemahnya aktivitas antibakteri pada ekstrak etanolik *C. moschata* diduga karena masih terdapat banyak senyawa pengganggu yang tersari. Etanol sebagai

pelarut merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan berbagai senyawa polar, semipolar, maupun nonpolar. Sehingga pada seri konsentrasi 5%, 10%, 25% dan 50% hanya mengandung sedikit senyawa aktif yang dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Hal ini mengakibatkan ekstrak etanolik biji *C. moschata* memiliki aktivitas yang kurang efektif jika digunakan sebagai agen terapi antibakteri terhadap *S. aureus*.